

ICS

备案号: XXXXX

团 体 标 准

T/CECS XXX —XXXX

环保用微生物菌剂的菌种鉴定方法

Methods of Strain Identification for Microbial Blends in the Environmental
Protection

(征求意见稿)

202 - - 发布

202 - - 实施

中国工程建设标准化协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》和GB/T 20001.10-2014《标准编写规则 第10部分：产品标准》给出的规则起草。

本文件是按中国工程建设标准化协会关于印发《2019年第一批协会标准制订、修订计划》的通知的要求制定。

请注意本文件的某些内容可能直接涉及或间接涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中国工程建设标准化协会提出。

本标准由中国工程建设标准化协会市容环境卫生专业委员会归口。

本标准负责起草单位：华东师范大学。

本标准参加起草单位：复旦大学、上海工微所科技有限公司、上海环境卫生工程设计院有限公司。

本标准主要起草人：

本标准主要审查人：

目 次

前言.....	1
1 范围	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 菌种鉴定流程.....	2
5 鉴定方法.....	3
6 鉴定结果.....	5
7 鉴定报告.....	5
附录 A（资料性）常用培养基成分	6
附录 B（资料性）常见霉菌的形态特征观察	10
附录 C（资料性）环保用微生物菌剂中常见菌种类群的生理生化特征测定	11
附录 D（资料性）常用引物序列	12
附录 E（资料性）环保用微生物菌剂的菌种鉴定报告编制大纲	13

环保用微生物菌剂的菌种鉴定方法

1 范围

本文件规定了环保用微生物菌剂的菌种鉴定方法。
本文件适用于环保用微生物菌剂的菌种鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ/T 415 环保用微生物菌剂环境安全评价导则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 环保用微生物菌剂 *microbial blends for environmental protection*

由一种或多种从自然界分离纯化，通过自然或人工选育（未经基因改造）所获得微生物菌种（株）所组成的，应用于生态环境保护和污染防治的微生物菌剂。

[来源：HJ/T 415-2008, 3.1]

3.2 细菌 *bacterium*

个体微小，结构简单，主要以二分裂方式繁殖的单细胞原核生物。

3.3 放线菌 *actinomycete*

具有菌丝、以孢子进行繁殖、革兰氏染色阳性的原核微生物。

3.4 酵母菌 *yeast*

单细胞真核微生物，通常以芽殖或裂殖进行无性繁殖，极少数种可产生孢子进行有性繁殖。

3.5 霉菌 *mold*

菌体由分支或不分支的菌丝构成、不产生肉眼可见子实体的霉菌。

3.6 菌种 *species*

由表型特征相似、遗传性状相近的菌株组成，并与其他类群的菌株存在明显差异。

3.7 菌株 *strain*

属于同一个种或亚种，但来源不同的纯培养的后代。

3.8 培养物 culture

一定时间一定空间内微生物的细胞群或生长物。

3.9 纯培养物 pure culture

一定时间一定空间内由单一微生物细胞繁殖产生的细胞群或生长物。

3.10 纯度检测 purity examination

检测菌种是否为纯培养物的过程。

3.11 菌落 colony

在固态培养基上由单一微生物细胞生长繁殖形成的肉眼可见的细胞群体。

3.12 芽孢 spore

某些细菌在生长的一定阶段，在细胞内形成圆形、椭圆形或圆柱形结构，对不良环境条件具有较强抗性的休眠体。

3.13 鉴定 identification

根据通用的检索系统，对未知微生物菌株进行性状观察和测定，确定该微生物分类地位的过程。

4 菌种鉴定流程

环保用微生物菌剂的菌种鉴定流程见图. 1。

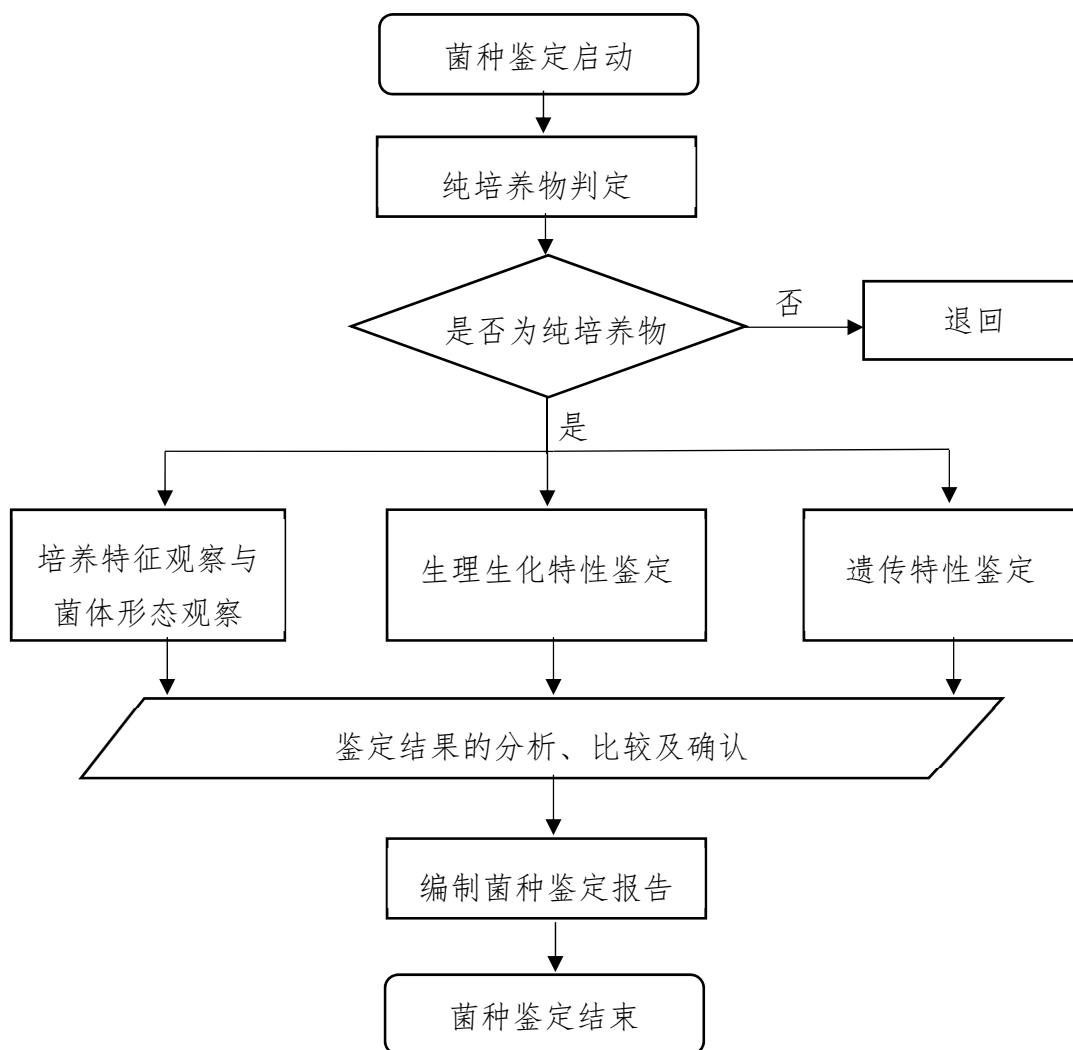


图 1 环保用微生物菌剂的菌种鉴定流程

5 鉴定方法

5.1 纯培养物检测

5.1.1 菌落形态观察

在适宜培养基平板上，将待鉴定培养物划线或稀释涂布，经适宜条件下培养后，选取划线或稀释涂布分离得到的单菌落，观察其在同一平板上的大小、形状、颜色、质地、光泽等。

5.1.2 菌体形态观察

挑取待鉴定细菌培养物，涂布于载玻片上无菌水滴中，进行简单染色或革兰氏染色；酵母菌和霉菌制成水浸片。显微镜下观察菌体形态。

5.1.3 纯度确定

菌落和菌体均形态一致者，可确定为纯培养物，可进行后续菌种鉴定工作；若非纯培养物，则退回。

5.2 培养特征观察方法

5.2.1 细菌

将待鉴定培养物划线或稀释涂布于营养肉汤培养基（见附录 A）或其他适宜的细菌培养基平板上，适宜条件下培养 2d~5d 后，观察和记录幼龄和老龄菌落的大小、形状、质地、边缘、隆起、颜色、光泽、透明度等性状。

5.2.2 放线菌

将待鉴定培养物点植、划线或稀释涂布于适宜的培养基平板上，28℃ 培养 5d~15d，观察菌落的大小、形状、表面状况、气生丝、基内菌丝的颜色及可溶性色素。

5.2.3 酵母菌

将待鉴定培养物划线或稀释涂布于麦芽汁琼脂（见附录 A）平板上，25℃~28℃ 培养 3d~7d，观察菌落的大小、形状、质地、隆起、边缘、颜色、光泽等性状。

将待鉴定培养物接种于麦芽汁液体培养基（见附录 A）中，25℃~28℃ 培养 3d，观察是否形成菌膜、菌环或岛及沉淀。

5.2.4 霉菌

将待鉴定培养物点种或稀释涂布于 PDA 培养基（见附录 A）或察氏培养基（见附录 A）平板上，25℃~28℃ 培养 2d~14d，观察菌落质地、颜色、生长速度、色素的产生情况、渗出液、菌落背面的颜色等。

5.3 菌体形态特征观察方法

5.3.1 细菌

挑取在适宜培养基上生长的幼龄培养物，涂片、革兰氏染色，显微镜下观察菌体形状、大小、革兰氏染色反应等，观察芽孢的有无、形态和着生位置。

5.3.2 放线菌

将数个灭菌盖玻片均匀斜插入培养皿中将要凝固的培养基中，待培养基凝固后沿盖玻片与培养基的交接处划线接种放线菌，正置培养皿于 28℃ 培养数天，定期取出盖玻片，用显微镜观察气生菌丝、基内菌丝、孢子丝的形态，孢子着生方式、颜色或孢囊着生位置、孢囊的形状。

5.3.3 酵母菌

将待鉴定培养物接种于麦芽汁液体培养基（见附录 A）中，25℃~28℃ 培养 3d，挑取一环培养物，压滴法制成水浸片，观察细胞大小、形态和无性繁殖方式。在玉米粉琼脂（见附录 A）平板上划线接种待鉴定培养物，盖上盖玻片，25℃~28℃ 培养 3d~5d，低倍显微镜下

观察划线处是否形成假菌丝。在适宜生孢子培养基上观察孢子的形态特征。

5.3.4 霉菌

将待鉴定培养物接种于 PDA 培养基(见附录 A)或察氏培养基(见附录 A)平板或斜面上, 25℃~28℃培养 2d~14d, 挑取少量培养物压滴法制成水浸片, 或采用玻片培养法(见附录 B), 显微镜下观察菌体形态特征、无性繁殖体和有性繁殖体的形态特征(见附录 B)。

5.4 生理生化特性鉴定

参考附录 C 所列的待鉴定培养物类群及其他资料, 测定对应的生理生化项目。可利用微生物自动鉴定系统进行鉴定, 方法参照所利用的微生物自动鉴定系统技术资料。

5.5 遗传特性鉴定

细菌和放线菌可进行 16S rDNA 序列、gyrB 基因序列测序分析, 酵母菌、霉菌可进行 26S rDNA 中 D₁/D₂ 区域序列、18S rDNA 序列或 ITS 序列测序分析。序列测定的常用扩增引物见附录 D。

6 鉴定结果

根据实验结果, 对照通用的鉴定系统, 确定待鉴定菌株的分类地位。菌种名称采用国际命名规则, 使用属名和种加词的拉丁词, 并附加中文译名。有异名的应同时标注。

7 鉴定报告

菌种鉴定结果报告应列出送检单位、送检时间、样品编号、名称、数量、鉴定操作人姓名(签字)、鉴定技术负责人姓名(签字)、鉴定内容、结果等信息。采用微生物自动鉴定系统和(或)序列测定的, 应附上原始数据。

鉴定报告编制大纲可参考附录 E。

附录 A
(资料性)
常用培养基成分

A. 1 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0g
牛肉膏	3.0g
氯化钠 (NaCl)	5.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000ml
pH	7.0~7.2

A. 2 乳酸细菌培养基 (MRS 培养基)

蛋白胨	10.0g
牛肉膏	10.0g
酵母膏	5.0g
柠檬酸氢二铵 [(NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇]	2.0g
葡萄糖 (C ₆ H ₁₂ O ₆ •H ₂ O)	20.0g
吐温 80	1.0g
乙酸钠 (CH ₃ COONa•3H ₂ O)	5.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	2.0g
硫酸镁 (MgSO ₄ •7H ₂ O)	0.58g
硫酸锰 (MnSO ₄ •H ₂ O)	0.25g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	6.2~6.5

A. 3 高氏合成一号琼脂

硝酸钾 (KNO ₃)	1.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	0.5g
硫酸镁 (MgSO ₄ •7H ₂ O)	0.5g
氯化钠 (NaCl)	0.5g
硫酸亚铁 (FeSO ₄ •7H ₂ O)	0.01g
可溶性淀粉 [(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n]	20.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	7.2~7.4

A. 4 葡萄糖-天门冬素琼脂

葡萄糖 (C ₆ H ₁₂ O ₆ •H ₂ O)	10.0g
天门冬素	0.5g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	0.5g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	7.2~7.4

A. 5 无机盐淀粉琼脂

可溶性淀粉 [(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n]	10.0g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O)	1.0g
硫酸镁 (MgSO ₄ •7H ₂ O)	1.0g
氯化钠 (NaCl)	1.0g
硫酸铵 [(NH ₄) ₂ SO ₄]	2.0g
碳酸钙 (CaCO ₃)	2.0g
微量元素盐溶液	1.0mL
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	7.0~7.4

微量元素盐溶液:

硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1g
氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.1g
硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1g
蒸馏水	100mL

A. 6 燕麦粉琼脂

燕麦片	20.0g
微量元素盐溶液	1.0mL
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	7.2~7.4

微量元素盐溶液：同 A. 5。

在 1000mL 蒸馏水中煮沸 20.0g 燕麦片，通过纱布过滤，加微量元素盐溶液，补加蒸馏水至 1000mL。

A. 7 葡萄糖酵母膏麦芽膏琼脂 (GYM 琼脂)

葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.0g
酵母膏	4.0g
麦芽提取物	10.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	7.2~7.4

A. 8 察氏 (Czapeks) 培养基

蔗糖 ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	30.0g
磷酸氢二钾 ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.0g
硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5g
硝酸钠 (NaNO_3)	3.0g
氯化钾 (KCl)	0.5g

硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	6.0~6.5

A. 9 麦芽汁琼脂培养基

麦芽提取物	20.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	5.4~6.0

A. 10 玉米粉琼脂

玉米粉	12.5g
琼脂	5.4g
蒸馏水	300mL
pH	6.0~6.5

称取玉米粉,加300mL蒸馏水搅匀,60℃热水浴保温1h,用滤纸过滤,滤液加水至300mL。

A. 11 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA培养基)

马铃薯	200g
葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	20.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	1000mL
pH	6.0~6.5

称取去皮马铃薯200g切块,放入水中煮沸30min,用双层纱布过滤取汁,补足水至1000mL。

附录 B

(资料性)

常见霉菌的形态特征观察

B.1 玻片培养法

将灭菌的载玻片放入培养皿中，接种霉菌孢子，用无菌滴管吸取少量冷却到 45℃ 左右的马铃薯琼脂培养基，滴加到载玻片的孢子上，盖上灭菌的盖玻片，轻压使培养基成一薄层，适温下培养。如培养的时间较长，需注意保湿，防止琼脂培养基过早干燥。经过一定的时间培养，取出载玻片，显微镜下观察菌体的形态特征。

B.2 常见霉菌的形态特征观察

常见霉菌的菌体形态特征观察见表 B.1。

表 B.1 常见霉菌的菌体形态特征观察

类群	菌体形态特征观察主要内容
根霉、毛霉	菌丝分隔、分枝情况、假根的有无、着生方式；孢囊梗长短、簇生或单生、分枝的类型；孢囊形状、大小、内含孢囊孢子的数量；囊轴形状、大小、颜色；囊托的有无、形状、大小；孢囊孢子形状、大小；厚垣孢子的有无；接合孢子是同宗还是异宗配合、结合孢子柄形状、大小。
曲霉	菌丝分隔、分枝情况；分生孢子梗着生方式；分生孢子头和顶囊的形状、大小、颜色；瓶梗的层次、颜色；梗基的有无；分生孢子的形状、大小、表面情况。
青霉	菌丝分隔、分枝情况；分生孢子梗着生方式、分枝情况；帚状枝的形状；瓶梗、梗基和副枝数目、大小；分生孢子的形状、大小。
木霉	菌丝分隔、分枝情况；分生孢子梗的分枝状态；小梗的形状、大小；分生孢子的形状、大小、色泽；厚垣孢子的有无。

附录 C

(资料性)

环保用微生物菌剂中常见菌种类群的生理生化特征测定

环保用微生物菌剂中常见菌种类群的生理生化特征测定见表 C.1。

表 C.1 常见菌种类群的生理生化特征测定

类群	生理生化特征测定
芽孢杆菌	氧化酶；接触酶；卵磷脂酶；厌氧生长；糖、醇类发酵；V-P 测定；淀粉水解；酪素水解；丙酸盐利用，硝酸盐还原；脲酶水解；吲哚产生；苯丙氨酸脱氨酶；对温度、pH 的需求及耐受性；对盐的耐受性等。
乳酸杆菌	氧化酶；接触酶，葡萄糖产酸产气；碳水化合物发酵产酸；精氨酸产氨；淀粉水解；七叶灵水解；牛奶的凝固和胨化；硫化氢产生；明胶液化等。
根瘤菌	氧化酶，接触酶，碳源利用；BTB 反应；石蕊牛奶反应；营养肉汁生长；苯丙氨酸脱氨酶等。
放线菌	碳源利用；明胶液化；淀粉水解；牛奶的凝固和胨化；纤维素分解；硝酸盐还原；硫化氢产生；酪氨酸酶产生，类黑色素产生等。
酵母菌	碳源利用；糖类发酵；氮源的同化，在无维生素培养基中的生长情况测定；温度生长试验；尿素分解；脂肪酶分解；明胶液化，石蕊牛奶反应；对盐的耐受性；抗放线菌酮测试等。

附录 D
(资料性)
常用引物序列

常用引物序列见表 D. 1。

表 D. 1 常用引物序列

引物	序列	扩增产物
8f 1492r	正向 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 反向 5' -GGTACCTTGTTACGACTT-3'	16SrDNA, 约 1500bp
27f 1492r	正向 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 反向 5' -GGTACCTTGTTACGACTT-3'	16SrDNA, 约 1500bp
NL-1 NL-4	正向 5' -GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 反向 5' -GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	26SrDNAD1/D2, 500bp ~ 600bp
ITS1 ITS4	正向 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 反向 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS, 400bp~700bp
NS1 NS8	正向 5' -GTAGTCATATGCTTGTCTC-5' 反向 5' -TCCGCAGGTTACCTAC-3'	18SrDNA, 约 1800bp
Bc1 Bc2r	正向 5' -ATTGGTGACACCGATCAAACA-3' 反向 5' -TCATACGTATGGATGTTATTC-3'	gyrB 基因, 约 1200bp

附录 E

(资料性)

环保用微生物菌剂的菌种鉴定报告编制大纲

一、菌种鉴定基本信息

包括：送检单位、送检时间、样品编号、名称、数量、鉴定操作人签字、鉴定技术负责人签字等；

二、鉴定内容

1、菌种培养特征、菌体形态特征

2、菌种生理生化特征

3、菌种遗传特性检测

三、鉴定结果

四、附件（微生物自动鉴定系统和（或）序列测定原始数据等）